

## (12) NACH DEM VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. April 2004 (29.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/035091 A1(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 49/00

Dossenheim (DE). KIM, Yong-Keun [DE/DE]; Egerstr. 28 89231 Neu-Ulm (DE). HIEBL, Wilfried [DE/DE]; Pater-Rupert-Mayer-Str. 18, 89257 Illertissen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/011251

(22) Internationales Anmeldedatum:  
10. Oktober 2003 (10.10.2003)

(74) Anwalt: NÖTH, Heinz; Arnulfstrasse 25, 80335 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(30) Angaben zur Priorität:  
102 47 781.7 14. Oktober 2002 (14.10.2002) DE  
102 55 601.6 28. November 2002 (28.11.2002) DE

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FLUORON GMBH [DE/DE]; Biberkopfweg 1,

89231 Neu-Ulm (DE).

Zur Erklärung der Zwei-Buchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MEINERT, Hasso [DE/DE]; Hafnerweg 7, 89231 Neu-Ulm (DE). GÜNTHER, Bernhard [DE/DE]; Schriesheimer Str. 19, 69221



WO 2004/035091 A1

(54) Title: PRODUCTION OF A DYE FOR COLOURING CELLS IN THE HUMAN OR ANIMAL BODY

(54) Bezeichnung: HERSTELLUNG EINES FÄRBEMITTELS ZUR ANFÄRBUNG VON ZELLEN IM MENSCHLICHEN ODER TIERISCHEN KÖRPER

(57) Abstract: The invention relates to the use of a biocompatible pigment e.g. patent blue V or brilliant blue R for producing a dye for the non-cytotoxic visualisation of cells, especially limiting or separating membranes in the human or animal body, especially in the eye.

(57) Zusammenfassung: Verwendung eines biokompatiblen Farbstoffs, z.B. Patentblau V oder Brillantblau R zur Herstellung eines Färbemittels für die nicht zytotoxische Visualisierung von Zellen, insbesondere begrenzenden oder trennenden Membranen im menschlichen oder tierischen Körper, insbesondere im Auge.

**Herstellung eines Färbemittels zur Anfärbung  
von Zellen im menschlichen oder tierischen Körper**

5

Die Erfindung betrifft die Herstellung eines Färbemittels zur Anfärbung von Zellen im menschlichen oder tierischen Körper.

10 Hierzu ist es aus der WO 99/58160 bekannt, als Farbstoff Trypanblau zu verwenden. Diese aus der Klasse der Diazo-Farbstoffe bekannte Verbindung wird in einer wässrigen Lösung zum Einfärben der Vorderkapsel für eine Katarakt-Operation am Auge verwendet. Durch die Visualisierung der  
15 Vorderkapsel erkennt der Chirurg den Umriss der Kapsulorhexis, wodurch die Phakoemulsifikation erleichtert wird.

Bei Trypanblau handelt es sich um eine zytotoxische Substanz, wie beispielsweise aus Solomon K.D. et al.: Protective effect of the anterior lens capsule during extra-capsular cataract extraction, OPHTHALMOLOGY, vol. 96, no. 5, May 1989 (1989-05), 591-597 und Veckener M. et al.: Ocular toxicity study of trypan blue injected into the vitreous cavity of rabbit eyes, Graefe's Arch Clin Ex Ophthalmol (2002) 25: 239: 698-704 bekannt ist. Bei der Verwendung von Trypanblau ist daher die vollständige Ausspülung insbesondere des Augenbereiches, in welchem das Trypanblau als Färbemittel zum Einsatz gekommen ist, unmittelbar nach der Kataraktoperation erforderlich, um einen längeren Verbleib im Körper bzw. im  
30 Auge zu vermeiden.

Aus US-A-4,764,360 ist es bekannt, einem hochmolekularen Polymerisat, welches einen Träger bildet, einen Farbstoff mit einem Molekulargewicht von wenigstens 10.000 zuzufügen.

Hierdurch soll vermieden werden, dass der Farbstoff in das umgebende Körpergewebe eindringt. Der Farbstoff soll nur den hochmolekularen Träger einfärben.

5 Ferner ist es bekannt (E. Kutchera, „Vitalfärbung der abgehobenen Netzhaut und ihre Defekte“, Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 178, 72, 87 (1969)), zur Sichtbarmachung von die gesamte Netzhaut betreffenden Defekten in Fällen von Netzhautabhebung den Farbstoff Patentblau intra-  
10 vitreal zu injizieren. Für die intravitreale Injektion wurde eine 0,47%-ige Patentblau-Hyaluronsäure-Lösung verwendet. Die Visualisierung der Netzhautabhebung ist äußerst zeitaufwendig und ergibt sich erst einige Tage nach der Injektion.

15 Aufgabe der Erfindung ist es, die Herstellung eines Färbe-  
mittels mit fehlender Zytotoxizität zu schaffen, welches zur Sichtbarmachung von Membranen mit begrenzender oder trennender Funktion oder von durch Erkrankung entstandenen Membranen im menschlichen oder tierischen Körper geeignet ist.  
20 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Merkmale des Patentanspruches 1 gelöst. Die Unteransprüche beinhalten vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung.

25 Bei der Erfindung wird durch die Verwendung eines keinen Vitalfarbstoff darstellenden und biokompatiblen Farbstoffs trägerlos in einer physiologisch kompatiblen wässrigen Lösung von insbesondere Natriumchlorid, die mit einem Puffer auf ein pH von 6,8 bis 7,8, insbesondere etwa 7,4 einge-  
30 stellt sein kann, ein Färbemittel zum Anfärben von Zellen, insbesondere von trennenden oder begrenzenden Membranen im menschlichen und tierischen Körper geschaffen. Beim Einfärbemittel handelt es sich um einen nichtpolymeren, niedermolekularen, wasserlöslichen Farbstoff. Das bei der Erfindung

zur Anwendung kommende Einfärbemittel kann zur Vitalitätsprüfung eingesetzt werden, wobei jedoch im Unterschied zu herkömmlichen Vitalfarbstoffen mit dem bei der Erfindung zur Anwendung kommenden biokompatiblen Farbstoff neben den toten 5 Zellen zur Unterscheidung vom lebenden Material auch die lebenden Zellen eingefärbt werden können.

Vorzugsweise kommt als ein wasserlöslicher, niedermolekularer Farbstoff ein Triphenylmethan-Farbstoff zum Einsatz. Der 10 Farbstoff kommtträgerfrei zum Einsatz. Beispiele für derartige geeignete Farbstoffe sind Patentblau und Brillantblau R, wobei letzterer von der Proteinfärbung bei der Gelelektrophorese bekannt ist.

15 Bei Patentblau handelt es sich vorzugsweise um ein als Lebensmittelfarbstoff (L-Blau 3 = E 131) zugelassenes Patentblau V ( $C_{54}H_{62}CaN_4O_{14}S_4$ , MG: 1159,45).

Als Puffer kann ein Phosphat-, Hydrogencarbonat- oder 20 Citrat-Puffer, dessen pH-Wert mittels Natriumhydroxid eingestellt werden kann, verwendet werden. Die Konzentration des biokompatiblen Farbstoffs, z.B. von Patentblau V beträgt in wässriger Lösung vorzugsweise 0,6 bis 2,5 g/l, insbesondere etwa 1,2 g/l. Man erreicht eine spontane Einfärbung der gewünschten Bereiche im menschlichen oder tierischen Körper. 25

Das Färbemittel kann zum Anfärben der Linsenkapsel, insbesondere der Linsenvorderkapsel bei einer Katarakt-Operation verwendet werden. Die Anfärbung erfolgt vor der Kapsulorhexis und Phakoemulsifikation. 30

Für die Anfärbung wird das Kammerwasser durch eine korneale oder sklerale Tunnelinzision abgesaugt und die Vorderkammer anschließend mit einem Gas, insbesondere Luft gefüllt. Mit

einer Kanüle werden ca. 0,3 ml Färbemittellösung, z.B. von Patentblau V in die Vorderkammer verabreicht. Es entsteht die Anfärbung der Linsenkapsel, welche durch den Pupillenrand der Iris begrenzt ist. Nach einigen Sekunden wird zum 5 Auswaschen des nicht benötigten Farbstoffes die Vorderkammer mit einer Natriumchlorid-Lösung ausgespült.

Anschließend wird für die Durchführung der Katarakt-Operation in herkömmlicher Weise eine viskoelastische Lösung in 10 die Augenvorderkammer eingebracht. Aufgrund der blauen Verfärbung der Vorderkapsel tritt der Umriss der Kapsulorhexis klar hervor und lässt sich vom grauen Gewebe des Linsenkerns klar unterscheiden.

15 Ferner kann das Färbemittel zum Anfärben der Membrana limitans interna oder beispielsweise infolge von PVR (proliferative Vitreoretinopathie) entstandenen Membranen, insbesondere epiretinalen Membranen an der Netzhaut oder an der Rückfläche der Glaskörpergrenzmembran, insbesondere bei Netzhaut- und Glaskörperchirurgie zum Einsatz kommen.

Beim Entfernen, beispielsweise einer epiretinalen Membran von der Netzhaut wird mit Hilfe einer über die Pars plana eingebenden Kanüle der Farbstoff, beispielsweise Patentblau 25 V in ca. 0,3 ml der angegebenen Pufferlösung selektiv zur zu entfernenden Membran gebracht. Der Glaskörper kann vorher ganz oder teilweise durch eine Gasfüllung, wie sie in herkömmlicher Weise bei der Glaskörper- oder Netzhaut-, insbesondere Makulachirurgie zum Einsatz kommt, ersetzt sein.

30 Beim Anfärben der epiretinalen Membran kann gegebenenfalls eine Anfärbung des benachbarten Retinagewebes mit schwächerem Einfärbungsgrad erfolgen. Beim Entfernen der Membran von dem darunter liegenden, nichteingefärbten Retinagewebe ergibt sich dann ein guter Kontrast. Nach dem Anfärben wird

überschüssige Färbemittellösung ausgespült und der freie Raum durch den angesprochenen gasförmigen Glaskörperersatz angefüllt. Durch die Einfärbung ist es möglich, mit einem nicht beleuchteten oder nur schwach beleuchteten Instrumenten 5 beim Abtragen der Membran zu arbeiten. Hierdurch wird bei ausreichender Kontrastwahrnehmung die Lichttoxizität erheblich verringert. Insbesondere bei der Anwendung im Zusammenhang mit epiretinaler Membranen (Epiretinale Gliose, „macular pucker“, „surface wrinkling“) bildet der Einsatz der 10 Färbemittellösung eine wertvolle Hilfe beim Aufsuchen und Entfernen der Membranen.

Wenn bei Makulaforamen mit zunehmender Lochgröße die Entfernung der Membrana limitans interna erforderlich ist, erweist 15 sich die Einfärbung dieser Membran mit der Färbemittellösung als vorteilhaftes Hilfsmittel beim Aufsuchen und Entfernen dieser Membran während der Glaskörperchirurgie.

Ferner ist es möglich, ein viskoelastisches Material, beispielweise Hyaluronsäure, welches als Hilfsmittel bei der 20 ophthalmologischen Chirurgie zum Einsatz kommt, mit der wässrigen Färbemittellösung einzufärben. Insbesondere lässt sich hierdurch bei der Katarakt-Operation eine Verbesserung des Kontrastes des viskoelastischen Hilfsmittels gegenüber 25 dem intraokularen Gewebe, insbesondere der Augeniris und dem Fundusreflex erzielen.

Gegenüber dem herkömmlichen Trypanblau, welches teratogene oder mutagene Wirkung (Cahen RL: Evaluation of the teratogenicity of drugs, Clin Pharmacol. Ther, 1964, 5, 480-514 und 30 Produktinformation BLURHEX™, Dr. Agarwal's Pharma Ltd. Chennai (Indien)) hat, besitzt die erfindungsgemäße biokompatible Lösung, beispielsweise von Patentblau V oder Brillantblau R keine Zytotoxizität.

Zum Nachweis fehlender Zytotoxität wurden Mauszellen L 929 und ARPE-19-Zellen mit dem erfindungsgemäßen Färbemittel Patentblau V mit unterschiedlichen Konzentrationen über 68 bis 5 72 Stunden im Brutschrank behandelt. Die Vitalität der Zellen und eine abgeleitete Zytotoxizität wird durch Bestimmung des Proteingehalts der behandelten Zellkulturen gegenüber unbehandelten Kontrollkulturen quantitativ bestimmt. Mit einem Standard-Verfahren wird der Proteingehalt kolorimetrisch 10 ermittelt.

Dabei zeigt sich, dass eine Zytotoxizität in signifikanter Höhe entsprechend einer Wachstumshemmung von mehr als 30% nicht vorhanden ist.

15

Die Erfindung erweist sich insbesondere von Vorteil bei der Durchführung von Katarakt-Operationen mit dichten Katarakten und/oder schwer pigmentierten Fundi, bei denen der Fundusreflex nur schwach ausgebildet ist oder fehlt. Mit Hilfe des 20 Einfärbemittels erreicht man einen guten Kontrast zwischen der gefärbten Vorderkapsel und dem unterliegenden Gewebe.

Im folgenden werden Ausführungsbeispiele des Färbemittels in verschiedenen Pufferlösungen angegeben.

25

Beispiel 1

Patentblau V mit einer Konzentration von 1,2 g/l in einer Phosphat-Puffer-Lösung.

30

200 ml Lösung enthalten:

0,240 g Patentblau V

0,380 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ )

0,060 g Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ )

5 1,640 g Natriumchlorid (NaCl)

Natriumhydroxid zur pH-Einstellung.

Beispiel 2

10 Patentblau V mit einer Konzentration von 1,2 g/l in einer Hydrogencarbonat-Puffer-Lösung.

200 ml Lösung enthalten:

0,240 g Patentblau V

15 0,420 g Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )

1,640 g Natriumchlorid (NaCl)

Natriumhydroxid zur pH-Einstellung

Beispiel 3

Patentblau V mit einer Konzentration von 1,2 g/l in einer Citrat-Puffer-Lösung.

200 ml Lösung enthalten:

25 0,240 g Patentblau V

0,216 g Trinatriumcitrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ )

1,640 g Natriumchlorid (NaCl)

Natriumhydroxid zur pH-Einstellung

30 Identische Ausführungsbeispiele gemäß Beispiel 1, 2 und 3 können auch mit Brillantblau R mit einer Konzentration von 1,2 g/l hergestellt werden.

Vorzugsweise wird bei den Pufferlösungen der pH-Wert durch Natriumhydroxid eingestellt. Es ist jedoch auch möglich, die Lösung selbst auf den gewünschten pH-Wert (neutral, schwach sauer, schwach alkalisch) innerhalb des bevorzugten Bereiches von 6,8 bis 7,8 einzustellen. Die Einstellung der Konzentration von Patentblau auf vorzugsweise 0,6 bis 2,5 g/l, insbesondere etwa 1,2 g/l erfolgt durch eine entsprechende Menge an Patentblau V.

**Patentansprüche**

1. Verwendung einer wässrigen, physiologisch kompatiblen Lösung, in welcher ein Farbstoff, der keinen Vitalfarbstoff darstellt und biokompatibel ist, gelöst ist, zur Herstellung eines Färbemittels für die Anfärbung von Zellen im menschlichen oder tierischen Körper.  
5
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Färbemittel zur Anfärbung von begrenzenden oder trennenden Membranen, insbesondere im Auge her-  
10 stellt wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Färbemittel zur Anfärbung von aus einem Körperorgan, insbesondere dem Auge zu entfernenden Membra-  
15 nen hergestellt wird.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Färbemittel zur Anfärbung der Linsenkapsel des Auges hergestellt wird.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
20 wobei das Färbemittel zur Anfärbung der Linsenvorderkap-  
sel bei einer Katarakt-Operation am Auge hergestellt wird.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Färbemittel zur Anfärbung von durch Erkrankung  
25 in oder an einem Körperorgan, insbesondere der Netzhaut des Auges entstandenen Membranen hergestellt wird.
7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das Färbemittel zur Anfärbung epiretinaler Membra-  
nen hergestellt wird.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Färbemittel zum Einfärben einer insbesondere in der ophthalmologischen Chirurgie eingesetzten viskoelastischen Lösung hergestellt wird.
- 5 9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, bei welcher der Farbstoff in einem neutralen oder schwach sauren oder schwach alkalischen Puffer gelöst wird.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der Farbstoff in einem Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 bis 7,8 gelöst wird.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei ein Phosphat-, Hydrogencarbonat- oder Citrat-Puffer verwendet wird.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, 15 wobei die Konzentration des Farbstoffs in der Pufferlösung 0,3 bis 2,5 g/l, insbesondere etwa 1,2 g/l beträgt.
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei als Farbstoff ein Triphenylmethan-Farbstoff verwendet wird.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei als 20 Farbstoff Patentblau V verwendet wird.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei als Farbstoff Brillantblau R verwendet wird.
16. Färbemittel für die Anfärbung von Zellen im menschlichen oder tierischen Körper bestehend aus einer wässrigen, 25 physiologisch kompatiblen Lösung, in welcher wenigstens ein Farbstoff, der keinen Vitalfarbstoff darstellt und biokompatibel ist, gelöst ist.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/11251

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	US 2003/096334 A1 (BUONO LAWRENCE M) 22 May 2003 (2003-05-22) claims 1-10, 21-40 ---	1-16
X, P	WO 03 043548 A (VISCO DYE APS ; NIELSEN PER JULIUS (DK)) 30 May 2003 (2003-05-30) claims 1-15 page 14, line 22 ---	1-16
X	WO 02 07693 A (BURKETT DOUGLAS D ; ZILA INC (US)) 31 January 2002 (2002-01-31) claims 1,2 page 11, line 4 - line 10 ---	1,13-16
X	GB 2 026 015 A (MERCK PATENT GMBH) 30 January 1980 (1980-01-30) claims 1-14 ---	16 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 February 2004

Date of mailing of the international search report

18/02/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Siatou, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/11251

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 037 905 A (MERCK PATENT GMBH) 21 October 1981 (1981-10-21) the whole document ----	16
A	WO 99 58160 A (MELLES GERRIT REINOLD JACOB) 18 November 1999 (1999-11-18) cited in the application claims 1-10 ----	1-16
A	SOLOMON K D ET AL: "Protective effect of the anterior lens capsule during extracapsular cataract extraction" OPHTHALMOLOGY, J. B. LIPPINCOTT CO., PHILADELPHIA, PA, US, vol. 96, no. 5, 1 May 1989 (1989-05-01), pages 591-597, XP002082494 ISSN: 0161-6420 cited in the application the whole document ----	1-16
A	M. VECKENEER ET AL: "Ocular toxicity study of trypan blue injected into the vitreous cavity of rabbit eyes" GRAEFE'S ARCHIVE OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY, vol. 239, no. 9, 2001, pages 698-704, XP002268940 cited in the application the whole document -----	1-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 03/11251

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 1-12, 16 (all partially) because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

**see supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210**

3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP03/11251**Box I.2****Claims 1-12 and 16 (all partially)**

The current claims 1-12 and 16 relate to an inordinately large number of possible compositions and uses, of which only a small proportion are supported by the description in accordance with PCT Article 6 and/or can be regarded as having been disclosed in the application in accordance with PCT Article 5. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed to the parts of the claims that appear to be supported and disclosed in the above sense, that is the parts relating to the compositions disclosed in claims 13-15.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subject matter that has not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/11251

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 2003096334	A1	22-05-2003	US	2003097117 A1	22-05-2003
WO 03043548	A	30-05-2003	WO	03043548 A1	30-05-2003
WO 0207693	A	31-01-2002	WO	0207693 A1	31-01-2002
			AU	1840201 A	05-02-2002
			BR	0014130 A	20-08-2002
			EP	1301164 A1	16-04-2003
			NO	20021355 A	19-03-2002
			NZ	517637 A	30-05-2003
GB 2026015	A	30-01-1980	DE	2832491 A1	07-02-1980
			FI	792304 A	25-01-1980
			FR	2434394 A1	21-03-1980
			IT	1118123 B	24-02-1986
			JP	55018999 A	09-02-1980
			SE	7906296 A	26-01-1980
EP 0037905	A	21-10-1981	DE	3014563 A1	29-10-1981
			EP	0037905 A1	21-10-1981
			JP	56164956 A	18-12-1981
			US	4390518 A	28-06-1983
WO 9958160	A	18-11-1999	EP	0963759 A1	15-12-1999
			AT	232400 T	15-02-2003
			AT	234118 T	15-03-2003
			AU	757318 B2	13-02-2003
			AU	3853699 A	29-11-1999
			AU	758951 B2	03-04-2003
			AU	3853799 A	29-11-1999
			BR	9910287 A	09-01-2001
			BR	9910288 A	09-01-2001
			CA	2331605 A1	18-11-1999
			CA	2332039 A1	18-11-1999
			DE	69905355 D1	20-03-2003
			DE	69905871 D1	17-04-2003
			DK	1075284 T3	10-06-2003
			DK	1075285 T3	14-07-2003
			EP	0974367 A1	26-01-2000
			EP	1075284 A1	14-02-2001
			EP	1075285 A1	14-02-2001
			ES	2192848 T3	16-10-2003
			JP	3469198 B2	25-11-2003
			JP	2002514470 T	21-05-2002
			JP	3469199 B2	25-11-2003
			JP	2002514471 T	21-05-2002
			WO	9958159 A1	18-11-1999
			WO	9958160 A1	18-11-1999
			PL	343924 A1	10-09-2001
			PL	343925 A1	10-09-2001
			PT	1075284 T	30-06-2003
			SI	1075284 T1	31-08-2003
			SI	1075285 T1	31-10-2003
			TR	200003279 T2	21-03-2001
			TR	200003280 T2	21-02-2001

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/11251

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	US 2003/096334 A1 (BUONO LAWRENCE M) 22. Mai 2003 (2003-05-22) Ansprüche 1-10, 21-40 ---	1-16
X, P	WO 03 043548 A (VISCO DYE APS ; NIELSEN PER JULIUS (DK)) 30. Mai 2003 (2003-05-30) Ansprüche 1-15 Seite 14, Zeile 22 ---	1-16
X	WO 02 07693 A (BURKETT DOUGLAS D ; ZILA INC (US)) 31. Januar 2002 (2002-01-31) Ansprüche 1, 2 Seite 11, Zeile 4 - Zeile 10 ---	1, 13-16
X	GB 2 026 015 A (MERCK PATENT GMBH) 30. Januar 1980 (1980-01-30) Ansprüche 1-14 ---	16
	-/-	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*' A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*' E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*' L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*' O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Aussicht oder andere Maßnahmen bezieht
- \*' P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*' T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*' X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*' Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*' &' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
4. Februar 2004	18/02/2004
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Siatou, E

## INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/11251

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 037 905 A (MERCK PATENT GMBH) 21. Oktober 1981 (1981-10-21) das ganze Dokument ---	16
A	WO 99 58160 A (MELLES GERRIT REINOLD JACOB) 18. November 1999 (1999-11-18) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-10 ---	1-16
A	SOLOMON K D ET AL: "Protective effect of the anterior lens capsule during extracapsular cataract extraction" OPHTHALMOLOGY, J. B. LIPPINCOTT CO., PHILADELPHIA, PA, US, Bd. 96, Nr. 5, 1. Mai 1989 (1989-05-01), Seiten 591-597, XP002082494 ISSN: 0161-6420 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-16
A	M. VECKENEER ET AL: "Ocular toxicity study of trypan blue injected into the vitreous cavity of rabbit eyes" GRAEFE'S ARCHIVE OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY, Bd. 239, Nr. 9, 2001, Seiten 698-704, XP002268940 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2.  Ansprüche Nr. 1-12, 16 (all partially)  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-12, 16 (all partially)

Die geltenden Patentansprüche 1-12 und 16 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Zusammensetzungen und deren Verwendung, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Zusammensetzungen die in der Ansprüche 13-15 offenbart sind.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/11251

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 2003096334	A1	22-05-2003	US	2003097117 A1		22-05-2003
WO 03043548	A	30-05-2003	WO	03043548 A1		30-05-2003
WO 0207693	A	31-01-2002	WO	0207693 A1		31-01-2002
			AU	1840201 A		05-02-2002
			BR	0014130 A		20-08-2002
			EP	1301164 A1		16-04-2003
			NO	20021355 A		19-03-2002
			NZ	517637 A		30-05-2003
GB 2026015	A	30-01-1980	DE	2832491 A1		07-02-1980
			FI	792304 A		25-01-1980
			FR	2434394 A1		21-03-1980
			IT	1118123 B		24-02-1986
			JP	55018999 A		09-02-1980
			SE	7906296 A		26-01-1980
EP 0037905	A	21-10-1981	DE	3014563 A1		29-10-1981
			EP	0037905 A1		21-10-1981
			JP	56164956 A		18-12-1981
			US	4390518 A		28-06-1983
WO 9958160	A	18-11-1999	EP	0963759 A1		15-12-1999
			AT	232400 T		15-02-2003
			AT	234118 T		15-03-2003
			AU	757318 B2		13-02-2003
			AU	3853699 A		29-11-1999
			AU	758951 B2		03-04-2003
			AU	3853799 A		29-11-1999
			BR	9910287 A		09-01-2001
			BR	9910288 A		09-01-2001
			CA	2331605 A1		18-11-1999
			CA	2332039 A1		18-11-1999
			DE	69905355 D1		20-03-2003
			DE	69905871 D1		17-04-2003
			DK	1075284 T3		10-06-2003
			DK	1075285 T3		14-07-2003
			EP	0974367 A1		26-01-2000
			EP	1075284 A1		14-02-2001
			EP	1075285 A1		14-02-2001
			ES	2192848 T3		16-10-2003
			JP	3469198 B2		25-11-2003
			JP	2002514470 T		21-05-2002
			JP	3469199 B2		25-11-2003
			JP	2002514471 T		21-05-2002
			WO	9958159 A1		18-11-1999
			WO	9958160 A1		18-11-1999
			PL	343924 A1		10-09-2001
			PL	343925 A1		10-09-2001
			PT	1075284 T		30-06-2003
			SI	1075284 T1		31-08-2003
			SI	1075285 T1		31-10-2003
			TR	200003279 T2		21-03-2001
			TR	200003280 T2		21-02-2001